



## The Combined Effect of Copper Oxide and Magnesium Oxide Nanoparticles Against Some Water and Food Borne Bacteria

Mahboubeh Mirhosseini<sup>1\*</sup> , Azimeh Kargaran Bafghi<sup>2</sup> 

1. Prof. Assist of Microbiology, Department of Biology, Payame Noor University, Iran
2. M.Sc of Microbiology, Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran



### Article Information

#### Article Subject:

Food Microbiology

 10.30699/ijmm.13.4.233

#### Corresponding author:

Mahboubeh Mirhosseini  
Department of Biology, Payame  
Noor University, Iran

#### Email:

[m.mirhosseini@gmail.com](mailto:m.mirhosseini@gmail.com)

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** The incidence of foodborne infectious diseases has been stable and even increased in many countries. Improper use of antibiotics due to the prevalence of microbial diseases has caused drug resistance. So nanotechnology has many attractive applications in the food industry, such as food preservation and food quality control. By the reason, the absorptive and antibacterial features of copper oxide nanoparticles in combination with magnesium oxide nanoparticles in delete of bacteria were investigated.

**Materials and Methods:** The antibacterial activities of CuO NP in combination with MgO NP against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in culture media and fruit juice (mango, pomegranate, and peach) by agar diffusion and colony count method were explored. Electron microscopy was used to characterize the morphological characteristics of the bacteria tested after treatment with CuO and MgO NPs.

**Results:** The results of one-way ANOVA by 95% confidence showed that CuO and MgO NPs have antimicrobial activity on *E. coli* and *S. aureus*. An effect of synergism was observed when combining CuO and MgO NP. Electron microscopy photographs showed that treatment with the combination of MgO and CuO caused damage to the cell membrane. As a result, the leakage of intracellular contents kills the bacteria.

**Conclusion:** The combination of CuO and MgO nanoparticles can successfully control the growth of *E. coli* and *S. aureus* in liquid and juice medium. So, this combination treatment can reduce the required amount of CuO and MgO nanoparticles during the pathogen control process in the food industry.

**Keywords:** Nanoparticles, Copper Oxide (CuO), Magnesium Oxide (MgO), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Fruit Juice.

Received: 2019/08/07

Accepted: 2020/01/19

Available online: 2020/01/20

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### How to cite this article:

Mirhosseini M, Kargaran Bafghi A. The Combined Effect of Copper Oxide and Magnesium Oxide Nanoparticles Against Water and Food Borne Bacteria. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (4) :233-250

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

The outbreak of food-borne pathogens such as *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, and *Listeria monocytogenes* in food safety have attracted the public attention to the need for developing new antimicrobial materials in order to ensure food safety and extend its shelf- life (1, 2). Directly add antimicrobial agents to food or packaging materials during the food production processes a convenient method for controlling microbial contamination in food and increasing the shelf life of foods (3). Recently, inorganic antimicrobial materials, such as metal oxides, have been applied in various areas for controlling microbes (4, 7, 8, 9-11). The synergistic effect of antimicrobials reduces the number of antimicrobials needed in foods and reduces side effects (20, 21).

## Materials and Methods

The following bacterial strains used in this study: *Escherichia coli* PTCC1394 and *Staphylococcus aureus* PTCC1431 were purchased from Iranian microbial collection. CuO and MgO nanoparticles were purchased from SIGMA-ALDRICH and US Research Nanomaterials, respectively.

The agar diffusion method was used to investigate the antimicrobial properties of CuO and MgO nanoparticles. Antibacterial properties of CuO and MgO nanoparticle was examined by placing 20  $\mu$ l of the CuO and MgO nanoparticle solution (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 and 1.5 mg/ml) alone or in combination with each other on TSA medium inoculated with  $10^7$  cell/ml *E. coli* and *S. aureus*, respectively. Each concentration of CuO and MgO nanoparticle solution was placed on surface-inoculated TSA agars and incubated at 37 °C for 24h. The inhibition zone around each sample was applied to represent the antibacterial activity of each CuO and MgO nanoparticle's concentration (22).

To determine the antimicrobial property of CuO and MgO nanoparticles, the liquid Tryptic Soy Broth culture (TSB), which contained (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/ml) CuO and MgO nanoparticle solution alone or in combination with each other was inoculated with  $10^7$  cells/ml of *E. coli* and *S. aureus*, respectively. The samples were incubated at 37 °C,

and every three h for up to 24 h are examined by colony count method, respectively (23).

The fruit juice containing CuO and MgO nanoparticle solution (0, 0.5, and 1.5 mg/ml) alone or in combination with each other were prepared, respectively. The samples were inoculated with a mixture of *S. aureus*, and *E. coli* ( $10^7$  cells/ml). The samples were incubated at 25 °C, and bacterial counts were determined at 3, 8, and 24 h by colony count method, respectively (24).

Scanning electron microscopy was also used to show morphological changes of *S. aureus*, and *E. coli* after treatment with nanoparticles (24).

### Statistical analysis

Data were analyzed by SPSS software version 16. Analysis of variance, and Duncan's multiple range tests were applied to specify the significant difference of mean values. Unless stated otherwise, significance was expressed at 5% level.

## Results and Discussion

Antibacterial properties of CuO and MgO nanoparticle solution (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, and 1.5 mg/ml) alone or in combination with each other were measured using the inhibition zone method against *E. coli* and *S. aureus*. The results of the inhibition zone of different concentrations of CuO and MgO nanoparticle alone or in combination with each other had no inhibition zone on *E. coli* and *S. aureus* ( $P > 0.05$ ).

In this research, CuO and MgO NP treatments showed a synergistic effect, and they were effective in reducing the number of *E. coli* and *S. aureus* in the medium and the fruit juices. In other researches (reference), the combination of nanoparticles was synergistic and reduced the number of bacteria, which is following our findings. Figure 1 and 2 show the effect of CuO and MgO nanoparticle treatment on the growth of *E. coli* and *S. aureus* in TSB broth at 37 °C. Treatments with the CuO and MgO nanoparticle in combination with each other had a significant inhibitory effect on the growth of *E. coli* and *S. aureus* during 24h of incubation, compared to the control. Among the ten concentrations of CuO and MgO nanoparticles, the treatment with 0/5 CuO + 1/5 MgO nanoparticle was the most effective one for *E. coli* ( $P < 0.05$ ) and *S. aureus* ( $P > 0.05$ ).

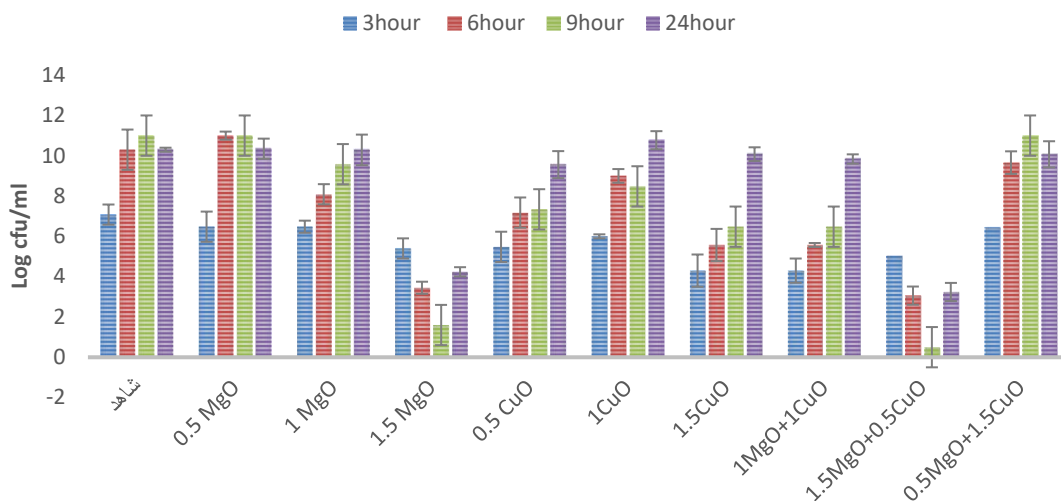


Figure 1. Effect of MgO and CuO Nanoparticles on *E. coli* in TSB (pvalue=0.00)

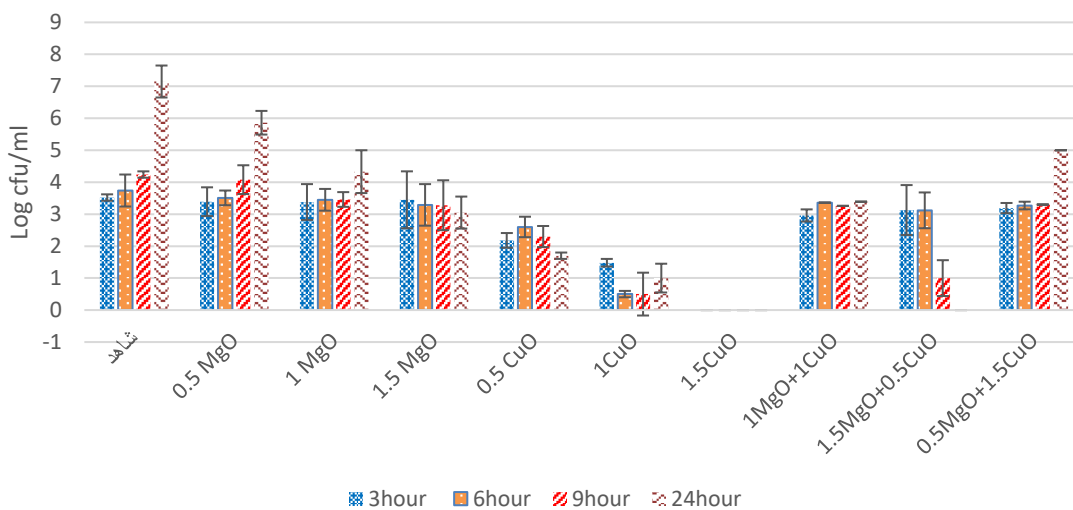


Figure 2. Effect of MgO and CuO Nanoparticles on *S. aureus* in TSB (pvalue=0.159)

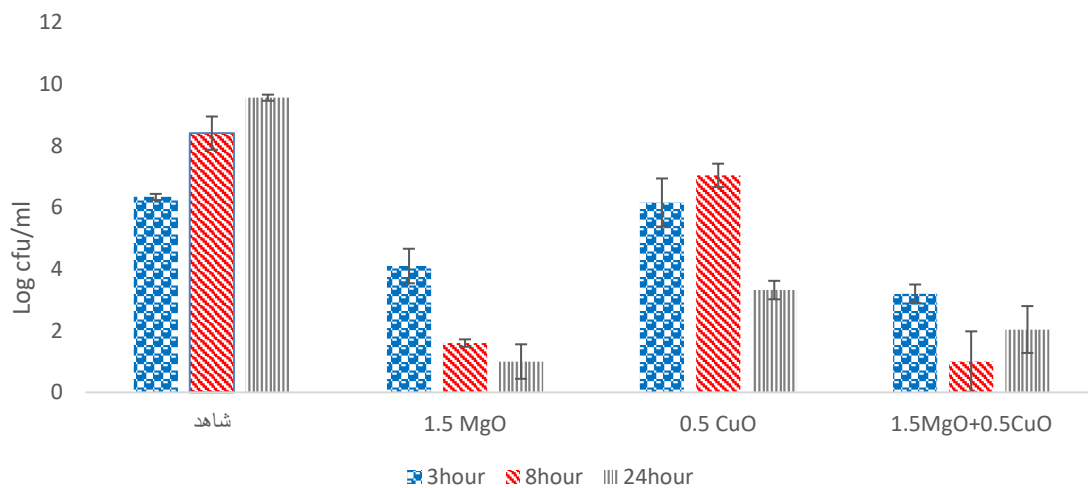


Figure 3. Investigation of the effect of MgO and CuO nanoparticles on *E. coli* bacteria in mango juice (pvalue=0.039).

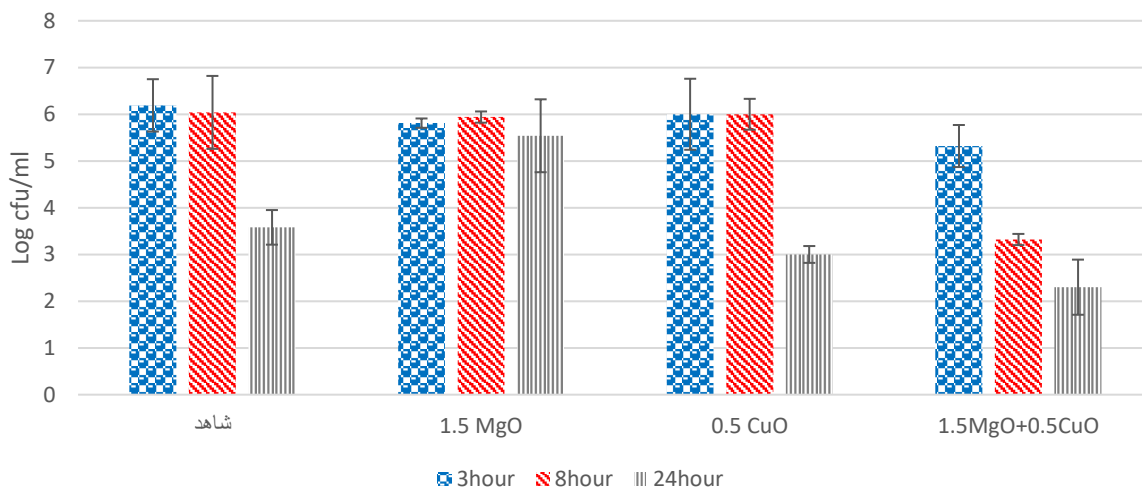


Figure 4. Investigation of the effect of MgO and CuO nanoparticles on *E. coli* bacteria in pomegranate juice (pvalue=0.642).

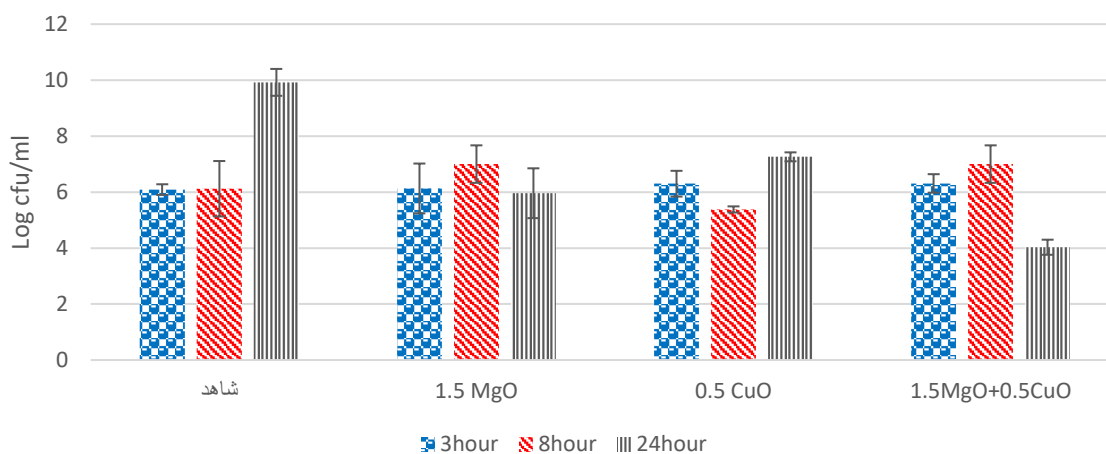


Figure 5. Investigation of the effect of MgO and CuO nanoparticles on *E. coli* bacteria in peach juice (pvalue=0.607).

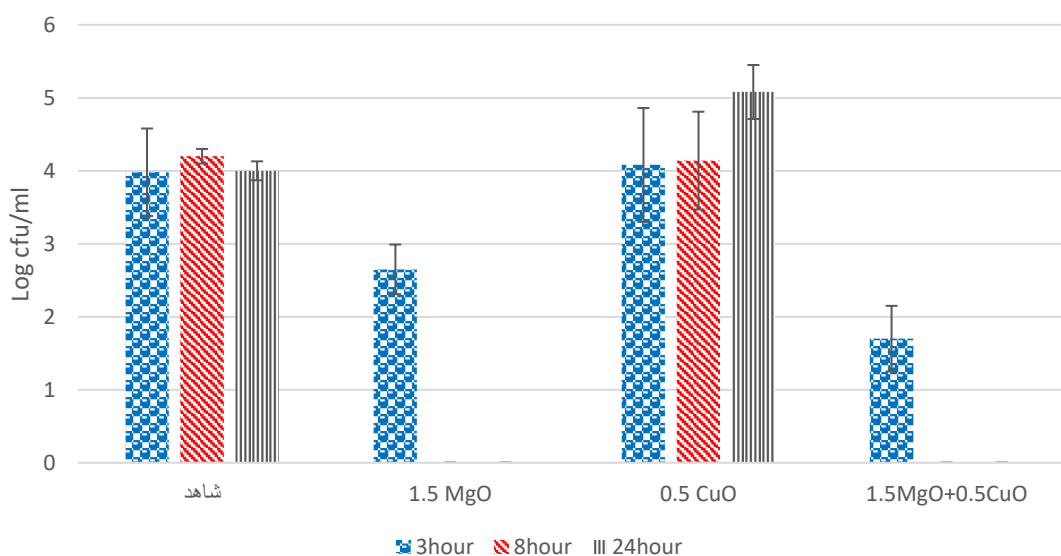


Figure 6. Investigation of the effect of MgO and CuO nanoparticles on *S. aureus* bacteria in mango juice (pvalue=0.278).

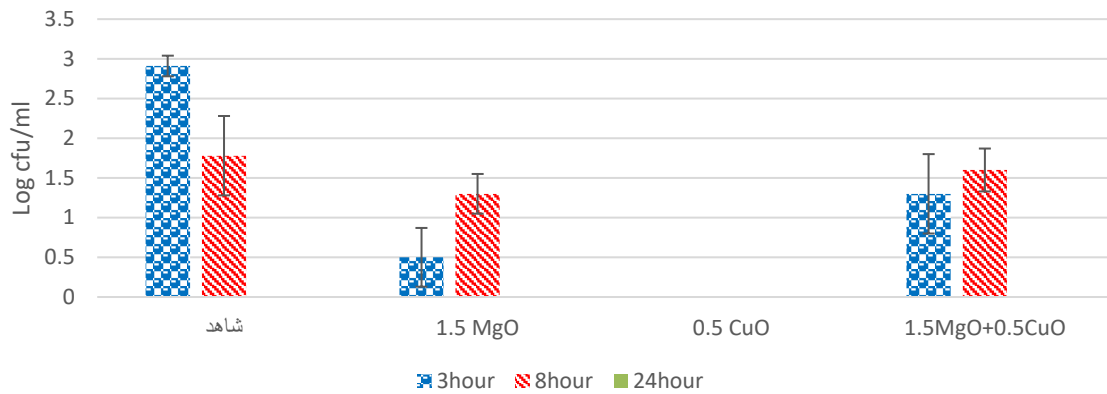


Figure 7. Investigation of the effect of MgO and CuO nanoparticles on *S. aureus* bacteria in pomegranate juice (pvalue=0.962).

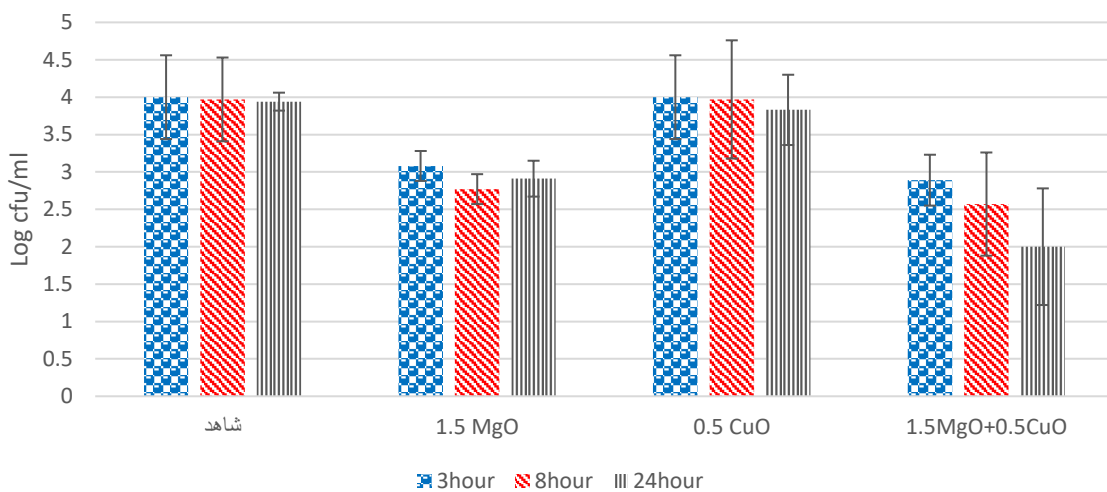


Figure 8. Investigation of the effect of MgO and CuO nanoparticles on *S. aureus* bacteria in peach juice (pvalue=0.779).

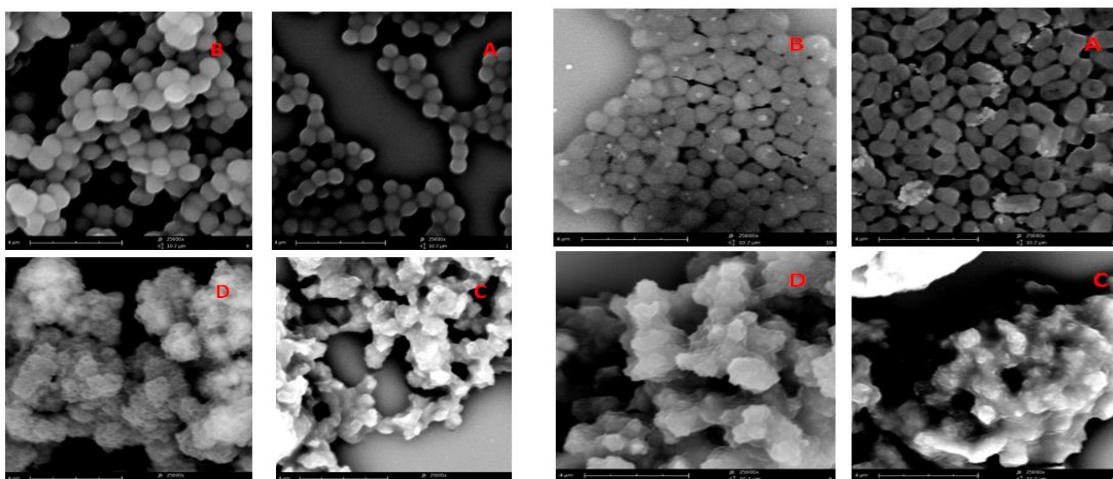


Figure 10. SEM image of *S. aureus* treatments with MgO and CuO nanoparticles. Bacteria were incubated with a: TSB alone (control), b: CuO NPs, c: MgO NPs, d: MgO / CuO NPs.

Figure 9. SEM image of *E. coli* treatments with MgO and CuO nanoparticles. Bacteria were incubated with a: TSB alone (control), b: CuO NPs, c: MgO NPs, d: MgO / CuO NPs.

The CuO and MgO nanoparticle were used as antimicrobial treatments in the fruit juices (mango, pomegranate, and peach). Effect of CuO and MgO nanoparticle on the growth of *E. coli* in fruit juice during 24 h of storage at 25 °C is demonstrated in figures 3, 4, and 5. Results showed that CuO and MgO nanoparticles could significantly inhibit or reduce *E. coli* in mango juice ( $P < 0.05$ ), pomegranate and peach juices ( $P > 0.05$ ).

Moreover, figures 6, 7, and 8 demonstrates that the antibacterial effect of MgO and CuO nanoparticles nanoparticle on *S. aureus*. Results showed that CuO and MgO nanoparticles could significantly inhibit or reduce *S. aureus* in mango juice, pomegranate, and peach juices ( $P > 0.05$ ). These findings implied that the treatment efficacy was more similar to the one obtained by MgO and CuO nanoparticle in the first set of experiments (Fig.2 and 3).

Based on the information available today, nanomaterials applied in the food industry include both inorganic and organic materials. Zinc oxide (ZnO) quantum dots, for example, has been used as an antimicrobial agent in liquid egg white samples (30). Similar inhibitory effects were observed for ZnO NP on the reduction of *S. aureus* and *E. coli* in milk samples. (24).

Jin and He (2011) examined the antibacterial activity of MgO NP alone or in combination with nisin or ZnO NP on *E. coli* O157: H7 and *Salmonella Stanley*. The results showed that the antimicrobial activity of MgO NP was vigorous. MgO NP showed a synergistic effect in combination with nisin. As well as in combination with the ZnO nanoparticles, their antibacterial activity is not synergistic against both pathogens (31).

SEM analysis of *E. coli* and *S. aureus* bacteria with and without nanoparticles treatment was performed to obtain definitive evidence of antimicrobial activity of the MgO and CuO nanoparticles. Figures 9 and 10 show electron microscopy of untreated *E. coli* and *S. aureus* (Fig. 9 and 10a), CuO treatment (Fig.9 and 10 b), MgO treatment (Fig. 9 and 10c), and MgO / CuO treatment (Fig. 9 and 10d) for 18 h in TSB.

As a control, untreated *E. coli* and *S. aureus* show rods and spheres shape in standard size, respectively, with cells whose structure is intact (Fig. 9, and 10a). Treatment with CuO nanoparticles reduces the number of *E. coli* bacteria and causes deformation on the cell surface and also creates troughs, but *S. aureus* in the vicinity of copper oxide nanoparticles has made the bacteria more adherent. (Fig. 9, and 10b). Treatment of bacteria with MgO NP causes severe damage to *E. coli* and *S. aureus* cells and resulting in the formation of cells with an irregular surface and change of membrane integrity (Fig. 9 and 10c). The combination of MgO / CuO has contracted cells and caused cell disintegration compared to healthy cells. These findings implied that the treatment efficacy was more similar to the one obtained by MgO and CuO nanoparticle in the first set of experiments.

## Conclusion

The The results showed that the combination of CuO and MgO nanoparticles had synergistic behavior and had a significant effect on the growth control of *S. aureus* and *E. coli* in liquid media and fruit juices. New formulations of CuO and MgO nanoparticles can be effectively applied to control infection in the future. Also, making new compounds from these nanoparticles could have a protective role in the food industry and reducing pasteurization temperatures.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the generous cooperation of the Nano Structured Coatings Institute, Yazd Payame Noor University, Yazd, Iran.

## Conflict of Interest

This article is the result of an independent study conducted without organizational financial support. In the present study, the authors showed no conflict of interest.



## اثر ترکیبی نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم در برابر باکتری‌های منتقل شده با آب و غذا

محبوبه میرحسینی<sup>۱\*</sup>، عظیمه کارگران بافقی<sup>۲\*</sup>

۱. استادیار و متخصص میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

۲. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** بروز بیماری‌های عفونی ناشی از غذا پایدار بوده و حتی در بسیاری از کشورها میزان این بیماری‌ها افزایش یافته است. استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها به علت شیوع بیماری‌های میکروبی باعث ایجاد مقاومت‌های دارویی می‌شود. بنابراین کاربردهای نانو تکنولوژی توجه زیادی را در صنایع غذایی مانند محافظت مواد غذایی و کنترل کیفیت مواد غذایی به خود جلب کرده است. به همین دلیل، خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدمس در ترکیب با نانوذرات اکسیدمنیزیم برای کشتن باکتری‌ها بررسی شدند.

**مواد و روش کار:** خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدمس در ترکیب با نانوذرات اکسیدمنیزیم علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت و آب‌میوه (انبه، انار و هلو) به روش انتشار در آگار و کلنی کانت بررسی شد. برای توصیف تغییرات مورفولوژیک باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* در اثر مواجهه با این نانوذرات بعد از تیمار ضد میکروبی با این نانوذرات، عکس‌های میکروسکوپ الکترونی استفاده شدند.

**یافته‌ها:** نتایج تحلیل آماری ANOVA یک طرفه با درجه اطمینان ۹۵ درصد نشان داد نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم، خاصیت ضد میکروبی علیه این پاتوژن‌های غذایی دارند. یک اثر سینرژیسم هنگام ترکیب نانوذرات اکسیدمس و نانوذرات اکسیدمنیزیم مشاهده شد. عکس‌های میکروسکوپی SEM نشان داد تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم سبب تخریب و آسیب‌های سلولی شده و در نتیجه نشت محتویات داخل سلولی منجر به مرگ سلول‌های باکتریایی شده است.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از تیمار ترکیب نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم می‌تواند در محیط کشت مایع و آب‌میوه، رشد *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را با موفقیت کنترل کند. همچنین این تیمار ترکیبی می‌تواند سبب کاهش حداقل مقدار مورد نیاز نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم در طول فرایند کنترل پاتوژن‌ها در صنایع غذایی شود.

**کلید واژه‌ها:** نانوذرات اکسیدمس (CuO)، اکسیدمنیزیم (MgO)، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، زمان ماندگاری

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیر تجاری با ذکر منبع آزاد است.

**تاریخچه مقاله**  
**دریافت:** ۱۳۹۸/۰۵/۱۶  
**پذیرش:** ۱۳۹۸/۱۰/۲۹  
**انتشار آنلاین:** ۱۳۹۸/۱۰/۳۰  
**موضوع:**  
میکروبیولوژی مواد غذایی  
IJMM1398;13(4):233-250  
**نویسنده مسئول:**

محبوبه میرحسینی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

ایمیل:  
[m.mirhossaini@gmail.com](mailto:m.mirhossaini@gmail.com)

### مقدمه

مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای غذایی شامل سالمونلا (*Salmonella*)، *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)، *شیگلا* (*Shigella*)، *کلستریدیوم بوتولینوم* (*Clostridium botulinum*)، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*)، *لیستریامونوسایتوزنز* (*Listeria monocytogenes*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) هستند (۲). شیوع بیماری‌های میکروبی ناشی از مصرف غذاهای آماده و استفاده نابجا از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت‌های دارویی در بین میکروارگانیسم‌ها می‌شود و این مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بیوفیلم‌های (Biofilm) مقاومی از میکروارگانیسم‌ها را در برابر سیستم ایمنی بدن به وجود آورده است (۴، ۳). بنابراین به علت

بروز بیماری‌های عفونی ناشی از غذا پایدار بوده و حتی در بسیاری از کشورها افزایش یافته است. تاکنون روش‌های مدرن تولید غذاها و برنامه‌های نظارت غذایی فشرده قادر به کنترل مؤثر این مشکل نبوده‌اند. با افزایش حجم تولید غذاهای آماده و در نتیجه توزیع آنها بین مصرف‌کنندگان، اگر محصول تولیدی آلوده باشد، باعث بروز بیماری‌های واگیردار در بین مصرف‌کنندگان خواهد شد. بر این اساس، بیماری‌های منتقل شده از طریق غذا یک نگرانی عمده بهداشتی در جامعه ایجاد کرده است که تأثیر زیادی بر جامعه دارد و بار مالی فوق العاده‌ای به سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی جامعه اضافه می‌کند (۱).

مثل نانوذرات، می‌توان از ترکیب دو نانوذره با یکدیگر بهره جست؛ به طوری که ترکیب دو نانوذره بر محدودیت استفاده هر یک از نانوذرات در حالت منفرد غلبه می‌کند. ترکیب نانوذرات در صورت انتخاب صحیح دو نانوذره می‌تواند فوایدی همچون گسترش عملکرد آن‌ها، استفاده از غلظت‌های پایین‌تر آن‌ها در حالت ترکیبی نسبت به حالت منفرد داشته باشد و در نتیجه باعث کاهش سمیت نانوذرات، جلوگیری از بروز مقاومت میکروبی به هر یک از نانوذرات در حالت منفرد و افزایش احتمالی فعالیت ضد میکروبی ترکیب دو نانوذره به بیش از آن میزانی که از یک نانوذره استفاده می‌شود، می‌گردد (۲۰، ۲۱).

هدف این تحقیق، بررسی اثر نانوذرات اکسید مس و اکسید منیزیم به صورت ترکیبی روی رشد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* برای دستیابی به ترکیب بهینه دو نانوذره در مهار رشد باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی (آب‌میوه) است.

### مواد و روش کار

#### مواد، محیط کشت و باکتری‌های استفاده شده

سویه‌های باکتری استفاده شده در این آزمایش شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC۱۴۳۱) و *اشریشیاکلی* (PTCC۱۳۹۴) بودند. باکتری‌ها از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شدند. محلول‌های استوک تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. باکتری‌ها در تریپتیکاز سوی آگار (TSA: Liofilchem, Italy) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس فعال شدند و تا زمان استفاده در دمای ۰ تا ۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. نانوذرات اکسیدمس از شرکت SIGMA-ALDRICH آمریکا خریداری شدند؛ قطر آنها کمتر از ۵۰ نانومتر بود و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (Transmission electron microscopy: TEM) (از طرف شرکت سازنده تأیید شد (-1317 CAS Number 38-0). نانوذرات اکسیدمنیزیم نیز از شرکت Research Nanomaterials آمریکا خریداری شدند؛ قطر آنها ۲۰ نانومتر بود و توسط شرکت سازنده با TEM و XRD تأیید شد (CAS Number: 1309-48-4). نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم در آب دوبار تقطیر استریل حل شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (الما سونیک، آلمان) همگن شدند. همه آزمایش‌ها با استفاده از محلول تازه نانوذرات انجام گرفت.

**بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و**

گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز به افزایش نظارت بر تولید و بسته‌بندی مواد غذایی برای بهبود کیفیت آنها دارد (۵). این موضوع محققان را وادار به توسعه دسته جدیدی از عوامل ضد میکروبی به عنوان ماده محافظ غذایی کرده است. یک روش مدرن و خلاقانه، استفاده از نانوذرات فلزی به عنوان ماده محافظ غذایی به منظور افزایش زمان ماندگاری و امنیت محصولات غذایی است. امروزه نانوذرات به طور وسیع در صنعت، لوازم آرایشی، بهداشتی و پزشکی استفاده می‌شوند و اطلاعات اندکی درباره مقاومت باکتری‌ها در برابر آن‌ها در دسترس است (۶). بنابراین، به عنوان جایگزین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، نانوذرات می‌توانند برای مهار و از بین بردن باکتری‌ها در محصولات غذایی استفاده شوند (۷).

اکسیدمس (CuO) یکی از ترکیبات بسیار مهم است که در صنعت به علت ارزان بودن، سمی نبودن، خواص الکتریکی و اپتیکی خوب، به طور وسیع در کاربردهای مختلف استفاده می‌شود (۸). یکی از نانوذرات کاربردی در صنعت و پزشکی، نانوذره اکسیدمنیزیم (MgO) است. نانوذرات اکسیدمنیزیم در حوزه پزشکی برای پوشش-دهی وسایل بیمارستانی جهت جلوگیری از انتشار آلودگی‌های میکروبی استفاده می‌شوند (۹، ۱۰).

همچنین نانوذرات اکسیدمنیزیم مزایایی همچون سمی نبودن، پایداری در مقابل حرارت، زیست سازگاری و ارزان قیمتی دارند. منیزیم چندین نقش حیاتی در بدن انسان ایفا می‌کند و کمبود آن باعث نقص در تنظیم فشار خون می‌شود. مکمل‌های دارویی منیزیم به شکل‌های اکسیدمنیزیم و هیدروکسید منیزیم هستند. همچنین امروزه اکسیدمنیزیم و هیدروکسید منیزیم به عنوان عامل کنترل کننده pH در محصولات لبنی و کنسروهای سبزیجات استفاده می‌شوند (۱۱).

با توجه به گستردگی کاربرد نانوذرات، تاکنون مطالعات گوناگونی درباره اثرات مختلف نانوذرات از جمله اکسیدمنیزیم روی سلول‌ها در دنیا انجام شده است. از جمله این مطالعات، بررسی اثرات نانوذرات اکسیدمنیزیم روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون (۱۲)، سلول‌های عصبی و فیبروبلاست (۱۳)، سلول‌های اندوتلیال عروق کوچک قلبی و سلول‌های اپیتلیال آلوئولار هستند (۱۴).

مکانیسم اصلی تأثیر نانوذرات بر باکتری‌ها از طریق آسیب به پروتئین، آسیب به DNA و تخریب دیواره سلولی است (۱۵، ۱۶). در بعضی مطالعات نشان داده شده است که خاصیت کشندگی نانوذرات در اثر تابش نور مرئی تشدید می‌شود (۱۷، ۱۸). بنابراین به دلیل نقاط هدف متعدد در میکروب‌ها تا به حال هیچ‌گونه مقاومتی در برابر اکسیدهای فلزی گزارش نشده است (۱۹).

گاهی برای افزایش خاصیت بازدارندگی رشد عوامل ضد میکروبی



## استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت جامد به روش قطره پلیت

## تهیه و آماده‌سازی آب‌میوه

میوه‌های انبه، هلو و انار جهت تهیه آب‌میوه از یک میوه فروشی خریداری شد. انبه با استفاده از دستگاه مخلوط‌کن کاملاً نرم گردید و به علت غلظت بسیار با آب مقطر استریل به نسبت ۱ به ۳ (غلظت ۳۳/۳۳ درصد) رقیق شدند. برای جلوگیری از اثر مواد داخل پوست انار، انار را دانه کردیم و آب آن را با آب‌میوه‌گیری دستی گرفتیم. آب هلو نیز با استفاده از دستگاه آب‌میوه‌گیری گرفته شد. آب میوه‌های انار و هلو به طور خالص جهت آزمایش‌ها استفاده گردیدند. همه آب‌میوه‌ها پس از گذراندن از کاغذ صافی، در دستگاه اتوکلاو (ریحان طب، ایران) در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند.

## افزودن نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم به آب‌میوه‌ها

آب‌میوه‌ها درون ارلن‌ها طبق محاسبات انجام شده براساس حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد. پس از اینکه آب‌میوه‌ها از اتوکلاو خارج شدند و دمای آنها پایین آمد، از غلظت  $1/5 + 0/5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم به صورت توأم و منفرد به هر یک از ارلن‌ها به طور جداگانه اضافه شد. سپس به هر یک از این ارلن‌ها به طور جداگانه  $10^7 \text{ cell/mL}$  مخلوط باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح گردید. بعد از آن، ارلن‌ها در ۵۰ دور در دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت شیک شدند. در این مرحله، رشد باکتری‌ها در ۴ بازه زمانی ۳ ساعت، ۸ ساعت و ۲۴ ساعت بررسی شدند؛ به این صورت که یک میلی‌لیتر از ارلن‌ها نمونه‌گیری شد و از این نمونه‌ها سری رقت تهیه گردید و تعداد باکتری‌ها به روش پلیت کانت آگار در دو محیط MSA (Mannitol salt agar) و EMB (Eosin methylene blue) تعیین شد. محیط EMB برای باکتری *اشریشیا کلی* و محیط MSA برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به کار برده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند (۲۳). به عنوان استاندارد از آب‌میوه‌ها بدون هیچ تیماری که فقط باکتری مورد آزمایش به آن تلقیح شده بود استفاده گردید.

## بررسی اثر توأم نانوذره اکسیدمس و اکسیدمنیزیم بر

## مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

از غلظت‌های  $1/5 + 0/5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم به صورت توأم و منفرد به هر یک از ارلن‌ها به طور جداگانه اضافه شد. سپس به هر یک از این ارلن‌ها به طور جداگانه  $10^7 \text{ cell/mL}$  باکتری‌های *اشریشیا کلی* و

برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم، ابتدا هر یک از باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به صورت چمنی روی پلیت‌های حاوی TSA به طور جداگانه کشت داده شدند. سپس از غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس به صورت منفرد و توأم برای بررسی خواص ضد میکروبی به روش قطره پلیت استفاده شد. به این منظور، ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های آماده‌شده از نانوذرات به صورت قطره‌ای روی پلیت‌های حاوی باکتری‌های مورد آزمایش قرار گرفتند و اجازه داده شد قطره‌ها خشک شوند. سپس هر پلیت در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن، از هاله عدم رشد در اطراف نمونه (قطره‌های خشک شده) برای نشان دادن فعالیت‌های ضدباکتری برای هر غلظت از نانوذرات استفاده شد. به عنوان استاندارد در یکی از نقاط مشخص شده در روی پلیت از دیسک آنتی‌بیوتیکی تتراسیکلین استفاده شد (۲۲).

## بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسیدمس و

## اکسیدمنیزیم بر منحنی رشد باکتری‌های *اشریشیا کلی* و

## *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت مایع

به هر کدام از ارلن‌ها حجم مناسب محیط کشت TSB اضافه شد و سپس جهت استریل کردن، ارلن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه تحت فشار ۱/۵ اتمسفر در اتوکلاو قرار داده شدند. پس از سرد شدن محیط کشت از غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانو اکسیدمنیزیم و اکسیدمس به صورت منفرد و توأم به صورت جداگانه به هر یک از ارلن‌ها در حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر اضافه شد. به عنوان گروه شاهد، ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل و بدون هیچ‌گونه نانوذرات به کار گرفته شد. سپس به هر یک از ارلن‌ها به طور جداگانه  $10^7 \text{ cfu/mL}$  باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شد و ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. میزان رشد باکتری‌ها به روش کلنی کانت در حضور غلظت‌های مورد نظر نانوذرات طی ۲۴ ساعت هر ۳ ساعت بررسی گردید؛ بدین ترتیب که هر ۳ ساعت، ۱ میلی‌لیتر از ارلن‌ها برداشتیم و در لوله‌ها رقیق شدند و تعداد باکتری‌ها به روش پلیت کانت آگار تعیین شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و سپس رشد باکتری در این محیط‌ها بررسی شد (۲۳).

## نتایج

### بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم بر باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت جامد

اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس و غلظت‌های توأم این نانوذرات در محیط کشت جامد علیه باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، بررسی شد. نتایج نشان داد اطراف نانوذرات، هاله عدم رشد ایجاد نشده است؛ بنابراین نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم در غلظت‌های به کار برده شده در این پژوهش در محیط جامد اثر مهاری نداشتند.

### بررسی اثر نانوذرات اکسی منیزیم و اکسیدمس بر منحنی رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس - اورئوس

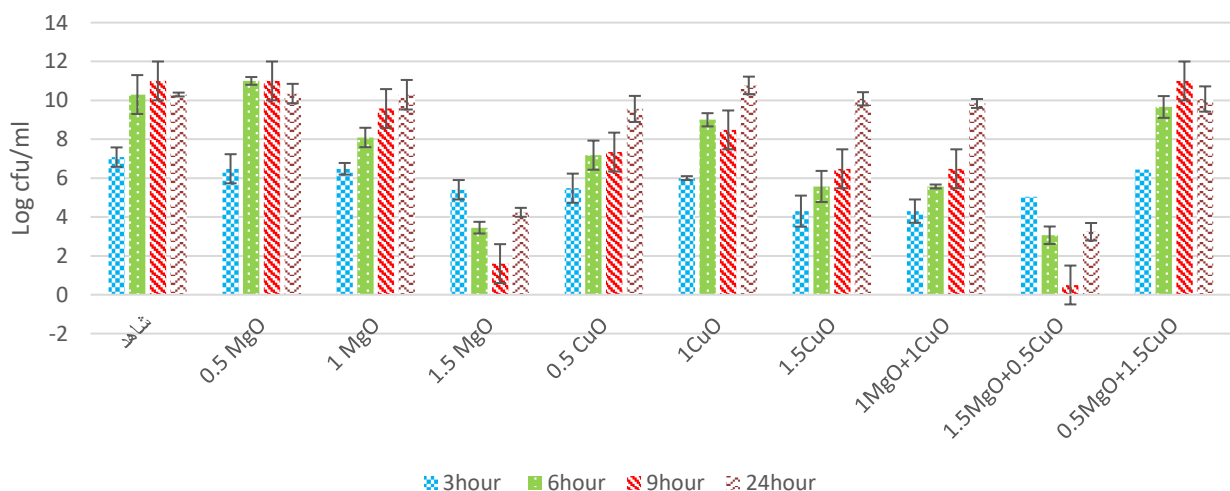
پس از استفاده نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس و غلظت‌های توأم این نانوذرات در محیط کشت مایع علیه باکتری‌های اشریشیاکلی نتایج به دست آمده حاکی از کاهش در تعداد سلول‌های باکتری‌های موردنظر است. پس از مشخص شدن خطای انحراف معیار، میزان اختلاف معنادار میانگین داده‌ها در حالت استفاده از نانوذرات با حالت کنترل (بدون نانوذرات)، در سطح معنادار  $P=0/00$  تعیین و محاسبه گردید. داده‌های پژوهش نشان داد ترکیب نانوذرات اکسید منیزیم و اکسیدمس ( $1/5 \text{ MgO} + 0/5 \text{ CuO}$ ) بیشترین تأثیر را بر کاهش رشد باکتری اشریشیاکلی دارند (شکل ۱).

استافیلوکوکوس اورئوس تلقیح گردید. سپس ارلن‌ها در ۵۰ دور در دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت شیک شدند. سپس سوسپانسیون‌های سلولی هر یک از نمونه‌ها به صورت جداگانه روی ورق میکا قرار داده شد و به مدت ۴۵ دقیقه برای خشک شدن در مجاورت هوا قرار گرفتند. سپس با محلول ثابت کننده ۲/۵ درصد گلو تار آلدئید و ۰/۱ مولار محلول بافر ایمیدازول  $(\text{pH}=2/7)$  به مدت ۲ ساعت فیکس شدند و با محلول ثابت کننده ۰/۱ مولار بافر ایمیدازول ثابت گردیدند. آگیری نمونه‌ها با غلظت‌های متفاوتی از محلول‌های اتانول ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد انجام گرفت. در نهایت ورقه‌های میکا روی پایه SEM با زبانه‌های چسبناک کربن قرار گرفتند و پوشش‌های تک‌لایه طلا برای کوت کردن روی نمونه‌ها اضافه شدند (۲۴).

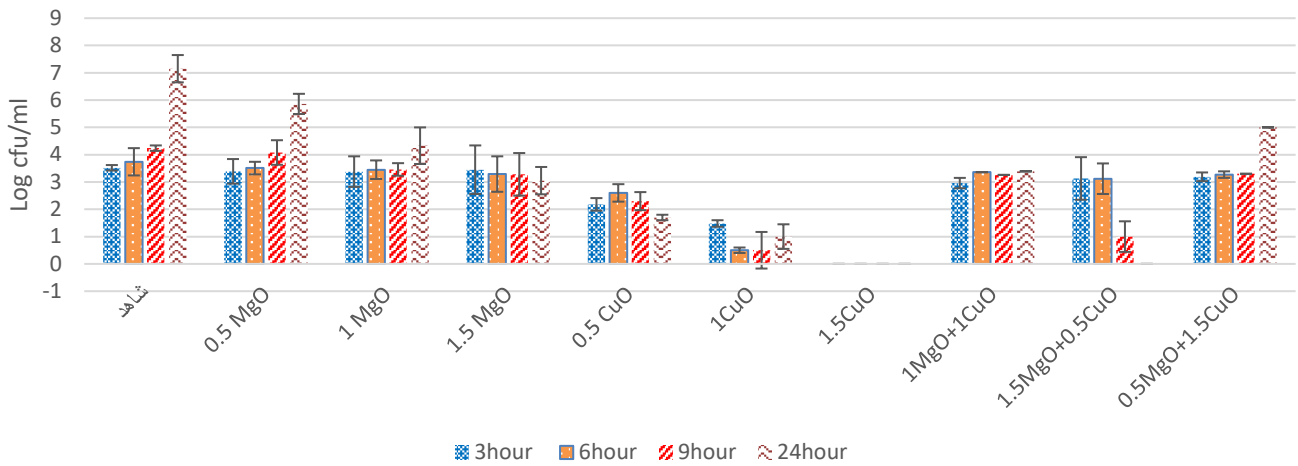
تصاویر سلول‌های باکتریایی اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده و تیمار نشده با میکروسکوپ الکترونی با بزرگ‌نمایی  $25000 \times$  ثبت شد.

## تحلیل‌های آماری

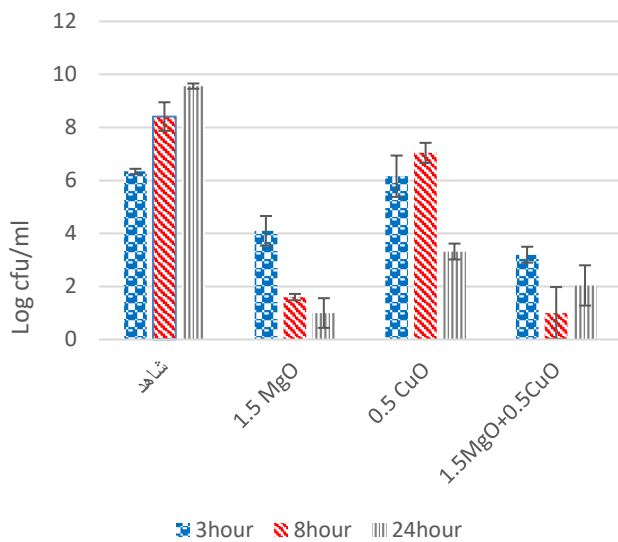
آزمایش‌های مختلف در سه تکرار انجام شد و اثر غلظت‌های مختلف اکسید مس و اکسیدمنیزیم بر میزان رشد باکتری‌ها با ANOVA یک‌طرفه بررسی شد. درصدهای به دست آمده در تست ANOVA برای تعیین اختلافات معنادار بین میانگین‌های گروه‌ها مقایسه شدند. Hoc tests Post برای مقایسه‌های چندگانه با درجه اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) انجام گرفت.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. روش مطالعه در این پژوهش از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده است.



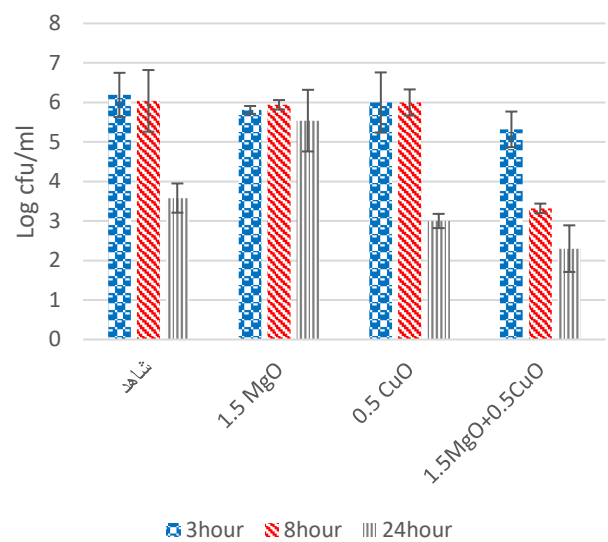
شکل ۱. اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر باکتری اشریشیاکلی در محیط کشت مایع ( $P=0.00$ )



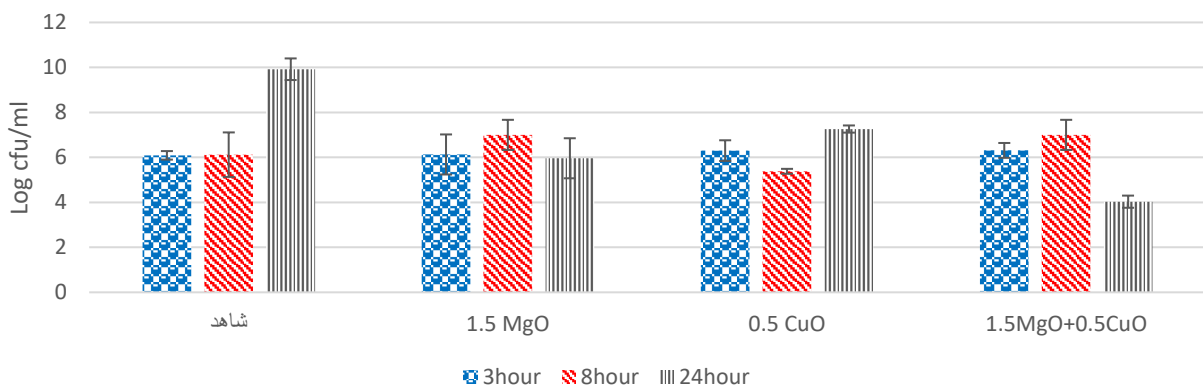
شکل ۲. اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مایع ( $P=0/159$ )



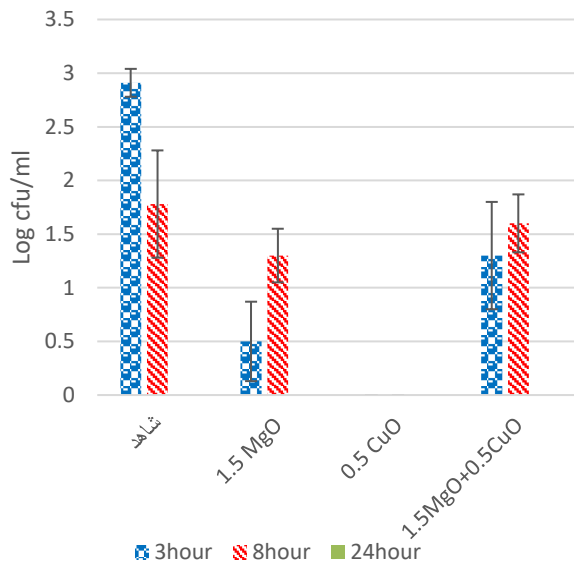
شکل ۴. بررسی اثر نانو ذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر باکتری‌های اشریشیاکلی در آب میوه انار ( $P=0.642$ )



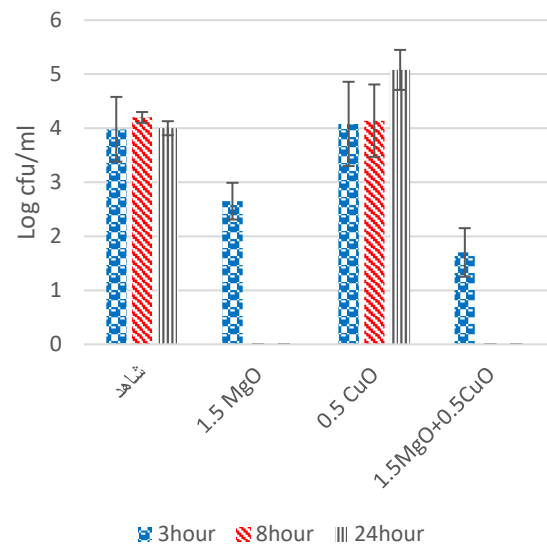
شکل ۳. بررسی اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر باکتری‌های اشریشیاکلی در آب میوه انبه ( $P=0.039$ )



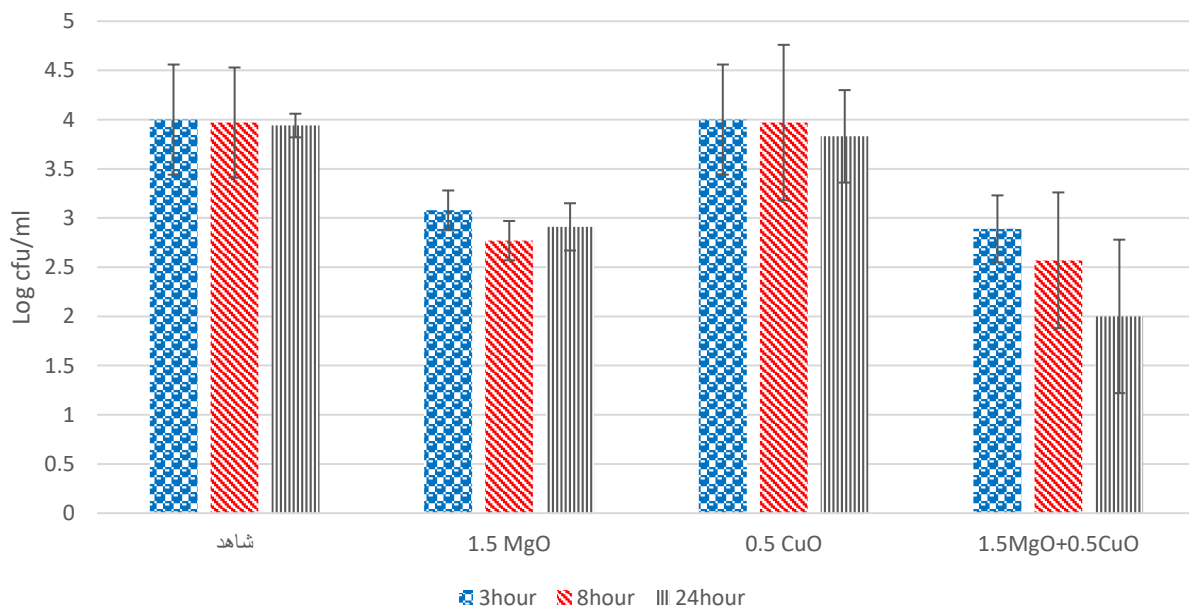
شکل ۵. بررسی اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر باکتری‌های اشریشیاکلی در آب میوه هلو ( $P=0.607$ )



شکل ۷. بررسی اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آبمیوه انار ( $P=0/962$ )



شکل ۶. بررسی اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آبمیوه انبه ( $P=0/278$ )



شکل ۸. بررسی اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آبمیوه هلو ( $P=0/779$ )

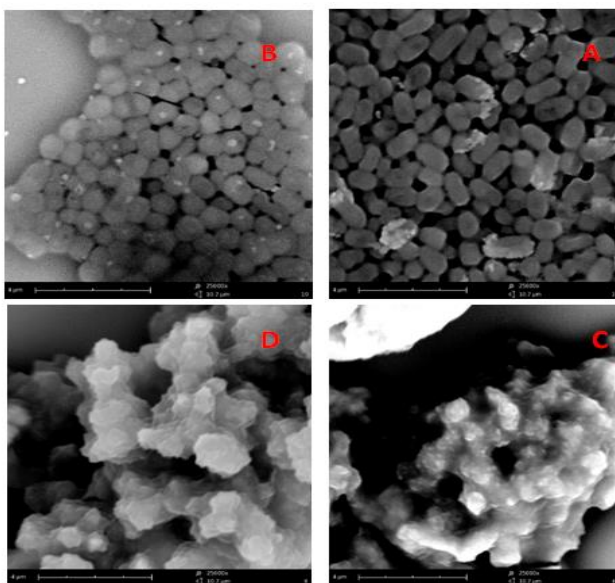
تأثیر قوی‌تری نسبت به بقیه تیمارها نشان دادند. همچنین داده‌های پژوهش نشان داد نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس ( $0/5\text{CuO} + 1/5\text{MgO}$ ) طی ۲۴ ساعت همان تأثیر را بر کاهش رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارند ولی برای باکتری

شکل ۲ اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم، اکسیدمس، و ترکیب نانوذره اکسیدمس و اکسیدمنیزیم در غلظت‌های مختلف علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را نشان می‌دهد. چنان که در این شکل مشهود است غلظت  $1/5$  میلی گرم نانوذرات اکسیدمس تنها نسبت به ترکیب نانوذرات اکسیدمنیزیم و نانوذرات اکسیدمس

آماري مقایسه اثر ترکیبات نانو اکسیدمنیزیم و اکسیدمس در این آب‌میوه‌ها بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ( $P=0/278$ ) ،  $P=0/962$  ،  $P=0/77$  به ترتیب برای آب‌میوه‌های انبه، انار و هلو) معنادار نبود (شکل‌های ۶، ۷، ۸ و ۹)

### بررسی اثر توأم نانوذره اکسیدمس و اکسیدمنیزیم بر مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

همان‌طور که شکل ۹-A نشان می‌دهد سلول‌های باکتری *اشریشیا کلی* به‌وضوح میله‌ای هستند و اندازه‌های نرمال و ساختاری سالم و دست‌نخورده دارند. شکل ۹-B نشان می‌دهد که در مجاورت نانوذرات اکسیدمس، تعداد باکتری *اشریشیا کلی* کاهش یافته و باعث تغییر شکل در سطح سلول شده و فرورفتگی‌هایی نیز ایجاد کرده است. شکل ۹-C نشان می‌دهد باکتری *اشریشیا کلی* در مجاورت نانوذره اکسیدمنیزیم، کاهش یافته و به‌شدت صدمه دیده است. شکل ۹-D نشان می‌دهد ترکیب نانوذره اکسیدمس و اکسیدمنیزیم، باعث انقباض سلول و فروپاشیدگی سلول نسبت به سلول‌های سالم شده است.



شکل ۹. تصویر SEM مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیا کلی* را در بزرگنمایی  $25000\times$  نشان می‌دهد. شکل A به عنوان شاهد در نظر گرفته شده است که تحت تأثیر هیچ گونه نانوذره‌ای نبوده است. شکل B مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیا کلی* در حضور غلظت  $0/5\text{CuO}$ ، شکل C مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیا کلی* در حضور غلظت  $1/5\text{MgO}$  و شکل D مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیا کلی* در حضور غلظت  $1/5\text{MgO}+0/5\text{CuO}$  را در بزرگنمایی  $25000\times$  نشان می‌دهد.

*استافیلوکوکوس اورئوس* میزان اختلافات میانگین‌ها معنی‌دار نبود ( $P=0/159$ ,  $P>0/05$ ).

### بررسی اثر نانوذرات اکسیدمس و اکسیدمنیزیم بر باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در آب‌میوه‌ها

در بررسی اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس، اثر این نانوذرات در حالت‌های منفرد و توأم با یکدیگر در آب‌میوه‌های مختلف بررسی شد. پس از نرمالیزه کردن داده‌های به دست آمده در این آزمایش، تعیین خطای انحراف معیار و معنادار بودن این آزمایش با استفاده از آزمون آماری ANNOVA یک‌طرفه مشخص گردید؛ نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس تأثیر مطلوبی بر جلوگیری از رشد باکتری‌های مورد آزمایش در بعضی از آب‌میوه‌های مختلف دارند. نتایج این شکل‌ها حاکی از کاهش تعداد سلول‌های این باکتری در هر سه آب‌میوه در حضور نانوذرات است. همچنین با توجه به تأثیر قوی‌تر نانوذرات اکسیدمنیزیم، ترکیب این نانوذرات با نانوذرات اکسیدمس باعث بروز رفتار سینرژیستی علیه باکتری *اشریشیا کلی* شده است؛ به طوری که در بین غلظت‌های موجود، غلظت ترکیبی  $0/5\text{CuO} + 1/5\text{MgO}$  بیشترین کاهش را در تعداد سلول‌های این باکتری را داشته‌اند. داده‌های آزمایش نتایج مربوط به تأثیر این نانوذرات علیه باکتری *اشریشیا کلی* را نشان می‌دهد و نتایج حاکی از کاهش تعداد سلول‌های این باکتری در آب‌میوه‌های انبه، انار و هلو در حضور نانوذرات و تأثیرگذاری ترکیب نانوذرات است اما با توجه به تحلیل داده‌ها و تعیین سطح معناداری برای رشد این باکتری در این سه آب‌میوه ( $P=0/642$ ،  $P=0/039$  و  $P=0/607$  به ترتیب برای انبه، انار و هلو) ترکیبات نانو اکسیدمنیزیم و اکسیدمس به لحاظ آماری فقط در آب‌میوه انبه بر باکتری *اشریشیا کلی*، مقایسه معنادار بود ولی در آب‌میوه‌های انار و هلو دارای سطح معناداری نبوده است ( $P>0/05$ ) (شکل‌های ۳، ۴ و ۵).

در این پژوهش از لحاظ میکروبیولوژی در بررسی جزء-به-جزء شکل‌ها، کاهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و تأثیر نانوذرات قابل مشاهده است. از جمله در محیط آب‌انبه، نانوذره  $1/5\text{MgO}+0/5\text{CuO}$  تأثیر کاهشی خوبی داشته و در ۲۴ ساعت، رشد باکتری‌ها را به صفر رسانده است. در محیط آب انار چون محیط مناسبی برای رشد این باکتری نیست، اثر نانوذرات نیز در کاهش رشد قابل بررسی نخواهد بود. براساس تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس و تعیین سطح معناداری برای سه آب‌میوه انبه، انار و هلو از نظر

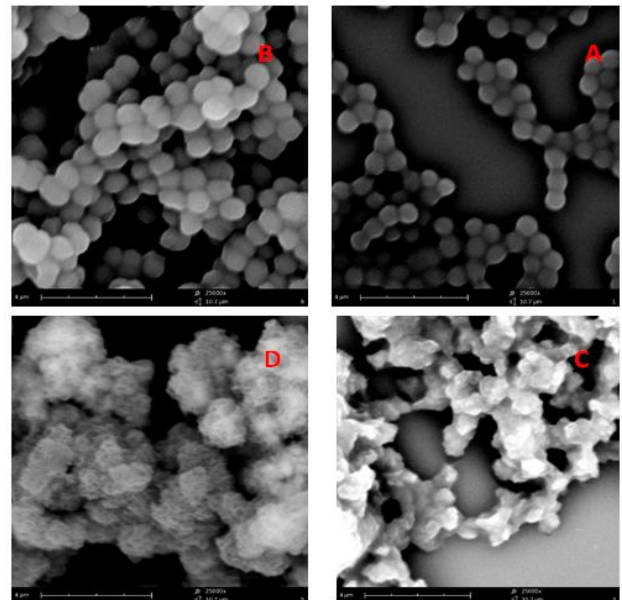
جانبی بیوفیلم مقاوم در برابر سیستم ایمنی بدن می‌شوند. با توجه به بیماری‌زایی و اثرات مخرب باکتری‌های مختلف و لزوم جلوگیری از رشد و افزایش آنها لازم است بهترین، کم‌هزینه‌ترین، و پربازده‌ترین روش‌های ممکن استفاده شوند. اخیراً دانشمندان با به‌کارگیری نانوذرات و بررسی اثر آنها بر انواع باکتری‌ها به دستاوردهای خوبی رسیده‌اند. همچنین استفاده از ترکیبات مختلف نانوذرات با برخی مواد ضدباکتریایی یا آنتی‌بیوتیک‌ها و حتی عصاره‌ی برخی از گیاهان دارویی نیز صورت گرفته است. نتایج مطالعات حاکی از آن است که در این زمینه با هرگونه نوآوری و تغییر در ترکیب، می‌توان اثرات جدید و قابل قبولی مشاهده کرد.

در این پژوهش با توجه به جستجوهای متعدد از مقالات و سایت‌های معتبر علمی دنیا و همچنین با مد نظر قرار دادن مواردی همچون صرفه اقتصادی، در دسترس بودن و اثرات متقابل دو نانوذره بر همدیگر و احتمال حساسیت‌زایی کمتر بر سلول‌های پستانداران از دو نانوذره اکسیدمس و اکسیدمنیزیم استفاده شد. نتایج تحقیق بیانگر این است که ترکیب این دو نانوذره با یکدیگر در محیط مایع و آب‌میوه در مقایسه با استفاده از هر یک از نانوذرات به تنهایی در اکثر مواقع باعث افزایش تأثیر ضدباکتریایی آنها شده و باعث کاهش چشمگیری در تعداد باکتری‌ها می‌شود. مناسب‌ترین ترکیب را 1/5 MgO + 0/5 CuO معرفی کرد که بالاترین میزان کشندگی را از خود نشان داد.

ترکیب دو یا چند نانوذره به منظور تعیین رفتار آنتاگونیسمی یا سینرژیستی، موضوع تحقیقات گسترده‌ای بوده است. Jafari و همکاران در سال ۲۰۱۱، در مطالعه خود، نانوذرات نقره و اکسیدروی را سنتز و خواص ضد میکروبی آنها را در حالت منفرد و ترکیب با یکدیگر بررسی نمودند. آنها مشابه با نتایج ما نتیجه گرفتند که ترکیب نانوذرات اکسیدروی و نقره باعث افزایش فعالیت باکتری‌کشی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها خواهد شد؛ با این تفاوت که آنها نانوذره اکسیدروی و نقره را با هم به صورت کامپوزیت سنتز کردند ولی ما دو نانوذره اکسیدمس و اکسیدروی را با هم مخلوط کردیم و اثر هم‌افزایی (سینرژیسم) آنها را بررسی کردیم (۲۵).

Kimiaee Sadr و همکاران در سال ۲۰۱۵، تأثیر ترکیب نانوذرات اکسیدمنیزیم، اکسیدروی (ZnO) و گرما را بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر مطالعه کردند. یافته‌های آنها نشان داد ترکیب دو نانوذره اکسیدروی، اکسیدمنیزیم بر باکتری‌های مذکور اثر سینرژیسمی دارد. ترکیب دو نانوذره اکسیدروی، اکسیدمنیزیم و حرارت ملایم در شیر باعث کاهش رشد

شکل 10، SEM سلول‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان می‌دهد. همان‌طور که شکل A-10 نشان می‌دهد سلول‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌وضوح کروی هستند و اندازه‌های نرمال و ساختاری سالم و دست‌نخورده دارند. شکل 10-B نشان می‌دهد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مجاورت نانوذرات اکسیدمس، باعث چسبندگی بیشتر باکتری‌ها به یکدیگر شده است. شکل 10-C نشان می‌دهد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مجاورت نانوذره اکسیدمنیزیم، آسیب دیده و ساختاری نامنظم ایجاد شده است. شکل 10-D نیز نشان می‌دهد ترکیب نانوذره اکسیدمس و اکسیدمنیزیم، باعث ایجاد فروپاشیدگی و از بین رفتن سلول شده است.



شکل ۸. تصویر SEM مورفولوژی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را در بزرگنمایی  $25000\times$  نشان می‌دهد. شکل A به عنوان شاهد در نظر گرفته شده که تحت تأثیر هیچ گونه نانوذره‌ای نبوده است. شکل B مورفولوژی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را در حضور غلظت 0/5CuO، شکل C مورفولوژی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور غلظت 1/5MgO و شکل D مورفولوژی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور غلظت 1/5MgO+0/5CuO در بزرگنمایی  $25000\times$  نشان می‌دهد.

## بحث

یکی از تلاش‌های اخیر برای از بین بردن عوامل بیماری‌زای مقاوم، استفاده از مواد نانو است. مواد نانو باعث از بین بردن عوارض

تخریب غشای سلولی و در نتیجه نشت محتویات سلولی و مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شود. غلظت‌های نانوذرات به کار رفته در این تحقیق مشابه کار ما بود؛ با این تفاوت که در این پژوهش به جای ترکیب نانوذره اکسیدمنیزیم و اکسیدمس از ترکیب اکسیدمنیزیم با اکسید آهن استفاده شده بود (۲۸).

Mirhosseini و Hoshmand Mavasti در سال ۱۳۹۶ در تحقیقی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدمس در ترکیب با نایسین و امواج فراصوت را علیه *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت و شیر بررسی کردند. یافته‌های پژوهش نشانگر آن بود که در محیط شیر اثر ترکیبی نانوذرات اکسیدمس و نایسین باعث کاهش رشد هر دو باکتری شده بود. همچنین نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد نانوذرات اکسیدمس و نایسین تغییرات قابل توجهی بر مورفولوژی و یکپارچگی غشای باکتری داشت و در نهایت، منجر به مرگ سلول باکتری شده‌اند. غلظت‌های نانوذرات به کار رفته در این تحقیق مشابه کار ما بود؛ با این تفاوت که در این پژوهش به جای ترکیب نانوذره اکسیدمنیزیم و اکسیدمس از ترکیب اکسیدمس با نایسین استفاده شده بود (۲۹).

در حال حاضر، استفاده از نانوذرات در سلامت مواد غذایی رو به افزایش است؛ برای مثال، اکسید روی کوانتومی به عنوان تیمار ضد میکروبی در نمونه سفیده تخم مرغ مایع استفاده شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت اکسیدروی کوانتومی به طور قابل توجهی رشد *لیستریا منوسایتوزنز* و *سالمونلا انتریدیس* در سفیده تخم مرغ مایع کاهش یافته است (۳۰). اثرات مہاری مشابه برای نانوذرات اکسیدروی بر کاهش *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در نمونه‌های شیر مشاهده شده است (۲۴).

Jin و همکاران فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسیدمنیزیم را به تنهایی یا با ترکیب با مواد ضد میکروبی مانند نایسین و اکسیدروی بر *اشریشیاکلی* و *سالمونلا استانیلی* بررسی کردند. نتایج نشان داد نانوذرات اکسیدمنیزیم فعالیت ضدباکتریایی قوی دارند و در ترکیب با نایسین اثر هم‌افزایی از خود بروز می‌دهند؛ همچنین در ترکیب با نانوذرات اکسیدروی فعالیت ضدباکتریایی آنها هم‌افزایی ندارد (۳۱).

با این وجود، نمی‌توان غلظت نانوذرات را به نسبت زیاد بالا برد، زیرا استفاده از این مواد در مواد غذایی دارای یک حد مجاز است. حد مجاز استفاده از نانوذرات در مواد غذایی در سازمان جهانی غذا و دارو تعیین شده است. این میزان در مورد نانوذرات مختلف و همچنین بسته به جنسیت و وزن بدن مصرف‌کننده متفاوت است. در مورد دو نانوذره مصرفی در این پژوهش، میزان مصرف مس مجاز

باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و افزایش زمان نگهداری شیر شده است. مطابق با گزارش آنها، حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) نسبت به *اشریشیاکلی* (گرم منفی) بیشتر بود. غلظت‌های به کار رفته برای ترکیب نانوذرات در این تحقیق، مشابه کار ما بود؛ با این تفاوت که در این پژوهش به جای ترکیب نانوذره اکسیدمنیزیم و اکسیدمس از ترکیب نانوذره اکسیدمنیزیم با اکسیدروی استفاده شده بود (۲۶).

با توجه به اینکه در استفاده از سوسپانسیون نانوذرات، احتمال ته‌نشین شدن نانوذرات وجود دارد و باعث کاهش احتمال برخورد باکتری-نانوذره می‌شود، بنابراین افزایش تماس و غلظت نانوذره می‌تواند اثر این عامل منفی را کم‌رنگ یا خنثی کند. همچنین با افزایش زمان تماس، میزان یون آزاد شده در محیط کشت در اثر انحلال جزئی نانوذرات، افزایش می‌یابد که خود بر کاهش جمعیت باکتری‌ها اثر مستقیم دارد (۲۷). Tiwari و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ در مطالعه خود، افزایش زمان تماس و غلظت نانوذرات را به عنوان عوامل تأثیرگذار بر مرگ باکتری‌ها ذکر کرده‌اند؛ مشابه نتایج به دست آمده در پژوهش ما نشان دادند که با افزایش غلظت نانوذرات و افزایش زمان تماس نانوذرات، قدرت میکروبی‌کشی نانوذرات افزایش می‌یابد (۲۷).

در این پژوهش، بررسی مورفولوژیکی باکتری‌ها توسط عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی SEM نیز صورت گرفت. نتایج نشان داد که ترکیب نانوذرات در مقایسه با استفاده از نانوذرات به تنهایی بیشترین تأثیر را بر مورفولوژی باکتری‌ها دارد. با توجه به نتایج این تحقیق، استفاده از این نانوذرات در کاهش رشد باکتری‌ها، مؤثر به نظر می‌رسد.

Torabi Zarchi و Mirhosseini در سال ۱۳۹۵ اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسید آهن ( $Fe_2O_3$ ) بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به صورت توأم در محیط مایع و آب‌میوه‌های هویج، انار، و سیب بررسی کردند. همچنین از میکروسکوپ الکترونی برای بررسی تغییرات مورفولوژیک *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تیمار ضد میکروبی استفاده کردند. نتایج آنها در محیط مایع و آب‌میوه‌ها مشابه نتایج ما نشان داد که ترکیب دو نانوذره، اثر ضدباکتریایی بهتری نسبت به نانوذره تنها دارند. مناسب‌ترین ترکیب ضدباکتریایی این دو،  $1/5 MgO + 0/5 Fe_2O_3$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشریشیاکلی* در برابر ترکیب نانوذرات بیشتر بود. اثر ترکیبی نانوذرات اکسید آهن و منیزیم باعث

مجاز مصرف روزانه (۳۲۰-۴۲۰ میلی گرم در روز) آن بسیار کمتر است. بنابراین مصرف آن نه فقط اثر سمی روی بدن ندارد بلکه به عنوان مکمل غذایی نیز محسوب می‌گردد. با توجه به معایبی که نانوذرات بر سلول‌های بدن انسان دارند، پیشنهاد می‌شود برای کاهش غلظت نانوذرات مورد استفاده می‌تواند ترکیب این نانوذرات با حرارت ملایم استفاده شود که یک روش امیدوارکننده در عرصه صنعت غذایی در جهت تقویت اثر عوامل ضد میکروبی و کاهش اثرات سمی ترکیبات مورد استفاده می‌گردد؛ همچنین موجب کاهش درجه حرارت پاستوریزاسیون مورد استفاده در صنایع غذایی می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این پروژه را دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر و پژوهشکده پوشش‌های نانوساختار دانشگاه پیام نور استان یزد حمایت کرده و نویسندگان از همکاری صمیمانه این مراکز تشکر می‌کنند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

در رژیم غذایی، برابر توصیه انجمن جهانی غذا و تغذیه، در بزرگسالان بین ۱/۵ تا ۳ میلی گرم در روز تعیین شده است (۳۲). حد مجاز اکسیدمنیزیم برای زن 310-320 میلی گرم و برای مرد 400-420 میلی گرم تعیین شده است (۳۱). همچنین این افزایش غلظت، احتمال ایجاد گونه‌های مقاوم به نانوذرات را نیز افزایش می‌دهد که یک تأثیر منفی محسوب می‌شود زیرا نبود گونه‌های مقاوم به نانوذرات، یکی از دلایل استفاده از نانوذرات علیه باکتری‌ها است.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، ترکیب توأم نانوذرات با نسبت  $1/5 \text{ MgO} + 0/5 \text{ CuO}$  میلی گرم در میلی لیتر نسبت به حالت منفرد آنها، بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در آب میوه انبه، انار و هلو، از لحاظ میکروبیولوژی تأثیر بسیار خوبی داشته و کاهش رشد خوبی دیده شد. بنابراین، نتایج نشان داد استفاده از نانوذرات اکسیدمنیزیم و اکسیدمس به صورت ترکیب با هم در مقایسه با استفاده از هر کدام از آنها به صورت منفرد اثر ضد میکروبی بهتری نشان می‌دهند. همچنین نتایج نشان داد بهترین حالت غلظت ترکیبی این نانوذرات ( $1/5 \text{ MgO} + 0/5 \text{ CuO}$  میلی گرم در میلی لیتر) است که به ویژه در مورد نانوذرة اکسیدمنیزیم از غلظت

### Referance

- Singh A, Poshtiban S, Evoy S. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors*. 2013; 13(2):1763-86. [DOI:10.3390/s130201763] [PMID] [PMCID]
- Matthews KR, Kniel KE, Montville TJ. *Food microbiology: An Introduction*. 4th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2014.
- Roy A, Gauri SS, Bhattacharya M, Bhattacharya J. Antimicrobial activity of CaO nanoparticles. *J Biomed Nanotech*. 2013; 9(9):1570-8. [DOI:10.1166/jbn.2013.1681] [PMID]
- Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley interdisciplinary reviews: Nanomed Nanobiotechnol*. 2010; 2(5):544-68. doi: 10.1002/wnan.103 [DOI:10.1002/wnan.103] [PMID]
- McNeece G, Naughton V, Woodward MJ, Dooley JS, Naughton PJ. Array based detection of antibiotic resistance genes in Gram negative bacteria isolated from retail poultry meat in the UK and Ireland. *Int J Food Microbiol*. 2014; 2(179):24-32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.019 [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.019] [PMID]
- Soltani Nezhad S, Rabbani Khorasgani M, Yaghoobi MM, Emtiazi G. Isolation of Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles resistant *Pseudomonas* strains from soil and investigation of Zinc resistance genes. *BJM*. 2014; 3(11):99-108. [DOI:10.1007/s11274-013-1481-3] [PMID]
- Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, et al. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol*. 2005; 39(11):4307-16. [DOI:10.1021/es048099n] [PMID]
- Balamurugan B, Mehta B. Optical and structural properties of nanocrystalline copper oxide thin films prepared by activated reactive evaporation. *Thin Solid Films*. 2001; 396(1):90-6. [DOI:10.1016/S0040-6090(01)01216-0]
- Park J, Lee Y, Jun K, Baeg JO. Chemical synthesis and characterization of highly oil dispersed MgO nanoparticles. *JIEC*. 2006; 12(6):882.



10. Shi LE, Xing L, Hou B, Ge H. Inorganic nano metal oxides used as anti-microorganism agents for pathogen control. In A. Mende-Vilas editor; Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Badajoz: Formatex Research Center; 2010.
11. Krishnamoorthy K, Moon JY, Hyun HB, Cho SK, Kim SJ. Mechanistic investigation on the toxicity of MgO nanoparticles toward cancer cells. *J Mater Chem*. 2012; 22(47): 24610-17. [DOI:10.1039/c2jm35087d]
12. Barkhordari A, Barzegar S, Hekmatimoghaddam H, Jebali A. The cytotoxic effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles on human blood mononuclear cells. *JSSU*. 2012, 20(1): 10-18. (persian)
13. Lai JC, Lai MB, Jandhyam S, Dukhande VV, Dukhande VV, Bhushan A, et al. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *Int J Nanomed*. 2008; 3(4):533-45. [DOI:10.2147/IJN.S3234] [PMID] [PMCID]
14. Sun J, Wang S, Zhao D, Hun FH, Weng L, Liu H. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells. *Cell Biol Toxicol*. 2011; 27(5):333-42. doi: 10.1007/s10565-011-9191-9 [DOI:10.1007/s10565-011-9191-9] [PMID]
15. Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 2008; 71(7):1308-16. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.047 [DOI:10.1016/j.chemosphere.2007.11.047] [PMID]
16. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M, et al. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *J. Nanopart. Res*. 2010; 12(5):1625-1636. [DOI:10.1007/s11051-009-9711-1]
17. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 2005; 213(1):66-73. [DOI:10.1016/j.tox.2005.05.007] [PMID]
18. Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJ, Jha AN. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res*. 2008; 640(1):113-122. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010 [DOI:10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010] [PMID]
19. Shetty RC. Potential pitfalls of nanotechnology in its applications to medicine: immune incompatibility of nanodevices. *Med Hypotheses*. 2005; 65(5):998-9. [DOI:10.1016/j.mehy.2005.05.022] [PMID]
20. Ruden S, Hilpert K, Berditsch M, Wadhvani P, Ulrich AS. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(8):3538-40. doi: 10.1128/AAC.01106-08 [DOI:10.1128/AAC.01106-08] [PMID] [PMCID]
21. Te Dorsthorst D, Verweij P, Meis J, Punt NC, Mouton JW. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(3):702-7. [DOI:10.1128/AAC.46.3.702-707.2002] [PMID] [PMCID]
22. Mirhosseini M, Emtiazi G. Optimisation of Enterocin A Production on a Whey-Based Substrate. *World Appl Sci J*. 2011; 14(10):1493-9.
23. Mirhosseini M, Afzali M. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of magnesium oxide nanoparticles in combination with nisin and heat against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in milk. *Food Cont*. 2016; 68:208-15. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.03.048 [DOI:10.1016/j.foodcont.2016.03.048]
24. Mirhosseini M, Firouzabadi FB. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. *Int J Dairy Technol*. 2013; 66(2):291-5. [DOI:10.1111/1471-0307.12015]
25. Jafari A, Ghane M, Arastoo S. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystals. *Afr J Microbiol Res*. 2011; 5(30):5465-73. [DOI:10.5897/AJMR11.392]
26. Kimiaee Sadr M, Mirhosseini M, Rahimi G. Effects of combination of magnesium and zinc oxide nanoparticles and heat on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria in milk. *NMJ*. 2016; 3(1):49-56.
27. Tiwari DK, Behari J, Sen P. Time and dose-dependent antimicrobial potential of Ag nanoparticles synthesized by top-down approach. *Curr Sci*. 2008; 95(5):647-655.
28. Torabi Zarchi T, Mirhosseini M. Investigation of combination effect of magnesium oxide and iron oxide nanoparticles on the growth and morphology of the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in juice. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*. 2017; 24(11):924-37.
29. Mirhosseini M, Houshmand Marvasti S. Antibacterial activities of copper oxide nanoparticle in combination with nisin and ultrasound against foodborne pathogens. *Iran J Med Microbiol*. 2017; 11(5):125-35.

30. Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H, Sue HJ. Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci.* 2009; 74(1):M46-52. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.01013.x [[DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.01013.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01013.x)] [[PMID](#)]
31. Jin T, He YP. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *J Nanopart Res.* 2011; 13(12):6877-85. [[DOI:10.1007/s11051-011-0595-5](https://doi.org/10.1007/s11051-011-0595-5)]
32. Klevay LM. Lack of a recommended dietary allowance for copper may be hazardous to your health. *J Am Coll Nutr.* 1998; 17(4):322-6. [[DOI:10.1080/07315724.1998.10718769](https://doi.org/10.1080/07315724.1998.10718769)] [[PMID](#)]

